

CONtrôles microbiologiques en hygiène hospitalière

Conseils pratiques

CCLIN Sud-Ouest

Liste des participants au groupe de travail

Responsable du groupe de travail :

Madame le Docteur Catherine QUESNEL - Médecin Hygiéniste - CHU de BORDEAUX

- **Madame le Docteur Hélène BOULESTREAU** - Médecin Hygiéniste - CHU de BORDEAUX
- **Monsieur le Docteur Olivier CASTEL** - Médecin Hygiéniste - CHU de POITIERS
- **Madame Michèle FENOT** - Biologiste - Hôpital SAINT JEAN DE LUZ : Centre Hospitalier de la Côte Basque
- **Madame le Professeur Nicole MARTY** - Président du CLIN - CHU de Toulouse Rangueil
- **Madame le Docteur Marcelle MOUNIER** - Pharmacien Hygiéniste - CHU de LIMOGES
- **Madame le Docteur Anne-Marie ROGUES** - Médecin Hygiéniste - CHU de BORDEAUX
- **Madame Christine ROQUES** - Pharmacien - Faculté de Pharmacie TOULOUSE
- **Madame le Docteur Isabelle SECHER** - Pharmacien Hygiéniste - CH d'ANGOULEME
- **Monsieur Charles TAMARELLE** - Biologiste - CH de LANGON
- **Monsieur le Docteur Xavier VERDEIL** - Médecin Hygiéniste - CHU de Toulouse Purpan

Introduction

Au terme de sa réflexion, le groupe de travail propose dans ce document les conseils qui lui sont apparus essentiels pour établir dans chaque établissement une stratégie adaptée concernant les contrôles microbiologiques de l'environnement, en particulier les contrôles d'eau, de surface et d'air.

Le groupe ne s'est volontairement pas positionné en terme de fréquence de ces prélèvements. En effet, hormis ceux qui sont imposés par la législation, il est difficile de définir une fréquence idéale applicable à toutes les institutions de soins et de prévention. Il appartient au CLIN de chaque établissement de définir ses exigences en la matière. Dans sa décision, il doit différencier les objectifs de ces prélèvements qui peuvent être réalisés :

- *à visée pédagogique,*
- *lors d'une enquête épidémiologique,*
- *pour le contrôle du bon fonctionnement d'une installation,*
- *pour le contrôle de l'efficacité d'une procédure.*

En tout état de cause, les contrôles de l'environnement sont faits pour s'assurer de la qualité d'une procédure programmée et mise en oeuvre et non pour attester de la non qualité d'une absence de procédure.

Ces conseils pratiques sont destinés en priorité aux biologistes des établissements travaillant en collaboration avec les CLIN, habitués à la bactériologie médicale mais moins familiers avec celle de l'environnement. En effet, une des limites observées actuellement dans le domaine de la microbiologie de l'environnement est l'absence de standardisation des techniques de prélèvements et d'analyse ce qui rend l'interprétation de certains résultats difficiles pour les services concernés.

SOMMAIRE

Fiche 1

Prélèvement de surface par application de boite de type « count tact »

Existence d'un projet de Norme Européenne portant la référence française NF EN 1632 - 3, intitulée: Méthodes d'analyse et de mesurage de la biocontamination des surfaces dans les zones à risques. Ce projet a été élaboré par le Comité Technique CEN/TC 243 « Technologie des salles propres ».

Type de surface :

- Toute surface plane, lisse et sèche

Modalités :

Noter les conditions du prélèvement (avant ou après nettoyage et/ou désinfection, traitement d'air en fonctionnement ou non, conditions d'utilisation du local, etc.), l'heure et le lieu.

Matériel utilisé :

- Boite type count tact possédant un ménisque de milieu de culture convexe et offrant une surface de contact d'au moins 20 cm2
- Applicateur permettant de standardiser le prélèvement (Force d'appui de 25g/cm2 pendant 10 secondes)

Délai d'acheminement et transport :

- 24 heures maximum à température ambiante

Milieu :

- Milieu pour flore totale avec neutralisant adapté au désinfectant utilisé pour les surfaces. Il est rappelé que le neutralisant pour le glutaraldéhyde est à base de tween plus lécithine ou histidine (1 à 3 %). Ce neutralisant est intéressant en particulier pour les prélèvements réalisés à l'intérieur des machines à laver les endoscopes.

Température et temps d'incubation :

- 72 heures à une température comprise entre 25° C et 30° C. Faire une première lecture. Il est recommandé selon le projet de norme de poursuivre l'incubation trois autres jours à température ambiante.
- 7 jours à température ambiante pour les fongiques.

Interprétation :

- Les seuils sont à définir en fonction des types de locaux et de leur niveau de risque. Il s'agit d'un comptage simple sans identification en routine en dehors de recherche ciblée.

A titre indicatif, vous trouverez ci-dessous les seuils présentés dans le guide du bionettoyage (Réf. 3) :

RISQUE	COLONIE PAR 25 cm²	COLONIE PAR cm²
4 et 3	< 5	< 0,2
2	< 50	< 2
1	< 125	< 5

"Ces valeurs sont données pour une superficie de gélose de 25 centimètres carrés. Elles doivent être considérées comme des moyennes à obtenir et, plus important que les valeurs absolues, l'évolution des comptages est un témoin précieux de la qualité du bionettoyage."

Le groupe de travail du CCLIN Sud-Ouest sur l'entretien des locaux des établissements de soins propose dans le document de septembre 1998 une classification des locaux selon le risque infectieux. Elle diffère quelque peu de celle du guide de bionettoyage, tout en gardant la même graduation du risque.

Le projet de norme cité ci-dessus donne des exemples d'enregistrement de niveaux cibles (le niveau 4 correspond ici aux locaux les plus à risque). Il appartient à chaque CLIN de déterminer des niveaux cibles différents en fonction du degré de danger de biocontamination de la zone et de la surface concernées par le prélevement. Les exemples suivants montrent comment les données de biocontamination de surface relatives à différentes zones à risque peuvent être mises en corrélation et enregistrées.

***Exemple 1* :**

Degré de danger ou de niveau de biocontamination de la zone	Niveau cible (UFC / 100 cm^2)
4	10
3	≤ 100
2	≤ 1000
1	≥ 10 000

***Exemple 2* :**

Degré de danger ou de niveau de biocontamination de la zone	Niveau cible (UFC / 100 cm^2)
4	20
3	≤ 200
2	≤ 2000

« Danger » traduit de l'anglais s'entend au sens de risque.

Fiche 2

Prélèvement de surface par écouvillonnage

Type de surface :

- Alternative aux boites de type count tact pour les zones difficiles d'accès, ou réalisé en complément de ces boites pour une recherche spécifique (par exemple recherche de Clostridium).

Modalités :

- Humidifier les écouvillons (eau distillée stérile, sérum physiologique, bouillon nutritif plus neutralisant, thioglycolate pour Clostridium). Passer l'écouvillon en stries parallèles rapprochées, en faisant tourner légèrement l'écouvillon mouillé. Répéter l'échantillonnage de la même zone par des stries perpendiculaires aux premières.
- Noter les conditions de prélèvements.

Matériel utilisé :

- Ecouvillon stérile.

Délai d'acheminement :

- Si supérieur à 4 h, mettre à + 4° C.

Technique :

- Soit ensemencer directement l'écouvillon sur milieux choisis dans le cas d'une recherche ciblée,
- Soit faire une subculture et ensemencer sur milieux sélectifs,
- Soit faire une dilution au dixième et ensemencer sur milieux choisis si empoussièrement important.

Température et temps d'incubation :

- En fonction des bactéries et des fongiques recherchés.

Interprétation :

- Il s'agit d'un résultat qualitatif qui présente surtout un intérêt pédagogique et épidémiologique.

Fiche 3

Contrôle de l'aérobiocontamination

Existence d'un projet de Norme Européenne portant la référence française NF EN 1632 - 4, intitulée: Méthodes d'analyse et de mesurage de l'aérobiocontamination en zone à risques. Ce projet a été élaboré par le Comité Technique CEN/TC 243 « Technologie des salles propres ».

Type d'air :

- Air des zones à empoussièrement contrôlé

Quantité :

Supérieur à 500 litres .

Modalités :

- Il est essentiel d'utiliser des dispositifs actifs d'échantillonnage de l'air pour évaluer la qualité microbienne de cet air. La technique par sédimentation sur boite ne doit donc plus être utilisée. Utiliser un appareil basé sur l'impact des particules viables à la surface d'un milieu nutritif gélosé.

- Si l'on se réfère à la norme NF S 90 - 351(décembre 1987) « Procédures de réception et de contrôle des salles d'opérations - qualité de l'air », l'appareil de prélèvement doit répondre aux exigences minimales suivantes:
  - le débit d'aspiration de l'appareil de prélèvement ne doit pas être inférieur à 100l/min (ce débit doit rester constant et vérifiable).
  - vitesse d'impact de l'air prélevé sur les milieux de culture suffisamment élevée pour permettre de prélever des particules viables de taille supérieure ou égale à environ 1micron, et suffisamment faible pour ne pas altérer la viabilité des micro organismes par détérioration mécanique. La vitesse d'impact doit être inférieure à 100m/s.

- Le préleveur s'habille conformément aux recommandations en vigueur dans la zone

- **Hors présence humaine et climatisation en marche. Ne pas parler. Rester calme.**

- Dans le cadre de la norme NF S 90-351, respecter les distances indiquées.
- En pratique, au minimum, au niveau de l'endroit à protéger (table d'intervention...),
- Noter l'heure et le lieu, ainsi que l'identité du préleveur

Délai d'acheminement :

- Si supérieur à 4 h, mettre à + 4° C.

Technique :

- Se conformer au mode d'emploi de l'appareil.

Milieux :
- Pour flore totale (gélose dénombrement) et/ou flore fongique à la demande (milieu au malte).
- Ne pas utiliser de milieux enrichis (par exemple gélose au sang).

Température et temps d'incubation :
- flore totale : 24 h à 37° C, 6 jours à 22° C. Le projet de norme propose 3 jours à une température comprise entre 25°C et 30°C plus 3 autres jours à température ambiante.
- flore fongique : pour *Aspergillus fumigatus* à 44° C pendant 48h, pour les autres à température ambiante pendant 7 jours.

Interprétation :

Sur le plan quantitatif :
- Dénombrer les UFC/m^3 et comparer le résultat aux résultats antérieurs et à la classe bactériologique du local prélevé.

A titre indicatif :

- B5 traitement d'air de type flux laminaire
- B20 traitement d'air de type plafond soufflant
- B100 classique

B indique qu'il s'agit d'une classe bactériologique.
Le chiffre qui suit indique le nombre maximum d'UFC/m3 rencontré dans l'air contrôlé.
Le projet de norme 1632-4 donne deux exemples d'enregistrements de niveaux cibles, en précisant bien que, dans le système ADPCM (analyse des points critiques maitrisables), l'utilisateur détermine lui-même les niveaux cibles de biocontamination. Les exemples suivants montrent comment les données de biocontamination de l'air relatives à différentes zones à risque peuvent être mises en corrélation et enregistrées.

***Exemple 1* : échantillonnage de l'air**

Degré de danger ou de niveau de biocontamination de la zone	**Niveau cible (UFC / m^3)**
4	1 *
3	≤ 10
2	≤ 100
1	≥ 1000
* prélèvement minimal : 1 m^3	

***Exemple 2* : échantillonnage de l'air**

Degré de danger ou de niveau de biocontamination de la zone	**Niveau cible (UFC / m^3)**
4	< 5
3	≤ 50
2	≤ 500
1	> 500

Sur le plan qualitatif :

- si bactérie dominante, faire l'identification ;
- si flore polymorphe et supérieure aux seuils, ne pas faire d'identification et reprélever. Si confirmation du mauvais résultat, rechercher l'origine de cette contamination.
- si flore fongique, dénombrer à 48 h et à 7 jours, identifier les Aspergillus.

Comptage particulaire

Le comptage particulaire ne fait pas partie des contrôles microbiologiques mais peut être un complément.

L'air ne contient pas seulement des micro-organismes. Il est envahi par une multitude de particules : c'est la contamination particulaire.

La contamination microbienne et particulaire peut avoir une origine humaine ou bien provenir d'autres sources (matériel, vêtements, literie,...).

L'origine humaine :

Elle est essentielle, à la fois par son importance numérique, et par son rôle éventuellement pathogène. En effet, l'être humain, dans des circonstances parfaitement physiologiques (respiration, desquamation), émet autour de lui en permanence un véritable nuage de particules. On a pu donner les chiffres suivants pour les particules de 0,5 micron et plus :

- au repos total 10 000 particules/minute,
- en remuant la tête et les bras : 500 000 particules/minute,
- en se déplaçant légèrement : 5 millions/minute.

Le nombre de germes ainsi déterminé donne une indication de la biocontamination, l'homme agit donc comme source de contamination et comme agent de transfert.

L'environnement :

La présence de particules peut être due à la pénétration de l'air extérieur par exemple en cas de filtration défectueuse ou de problème de différence de pression, à l'état des surfaces des locaux, sol, mur...

Le matériel :

- Les machines : la plupart des machines utilisées comportent des pièces en mouvement qui produisent des particules.
- Le petit matériel : certains objets en plastique notamment ont la propriété d'être électrostatiques, c'est à dire de se charger d'électricité par frottement et ainsi d'attirer et de fixer les particules de poussière.

Il existe dans les locaux hospitaliers une relation entre l'aérobiocontamination et la contamination particulaire. Il est cependant très difficile d'établir un rapport entre le nombre de particules et le nombre de germes dans l'air ambiant, cela dépend des zones et de l'activité qui s'y développe. Approximativement, on a une probabilité de trouver **un micro organisme pour 100 000 particules**.

Méthode de mesure de la contamination particulaire.

La méthode la plus simple utilise un compteur de particules, dont le principe est le suivant : toute particule, passant dans un faisceau lumineux, vient perturber la transmission de celui-ci.

En pratique, on utilise un faisceau laser, et on mesure le nombre de déviations, lorsqu'un certain volume d'air passe dans ce faisceau. L'amplitude de chaque déviation est proportionnelle à la taille de la particule. Il est donc possible de compter le nombre de particules dont la taille est supérieure à une valeur de référence.

Le seuil le plus bas que permet cette méthode est de 0, 3 micron. La taille des micro-organismes étant supérieure à ce seuil, on est assuré qu'ils seront dénombrés par cette méthode. La mesure est locale, et nécessite quelques minutes. Elle peut être effectuée très simplement et enregistrée, même au voisinage d'un champ opératoire.

Les différentes classifications de l'air.

Les classes d'empoussièrement particulaire.

On sait que, plus la contamination particulaire est faible, plus le risque d'érobiocontamination est diminué. Il existe des normes, qui permettent de classer les locaux en fonction du nombre de particules mesuré. On peut donc parler de **classes d'empoussièrement**. La "classe" d'une zone à contamination contrôlée est définie par :

- le nombre de particules présentes dans un volume et la taille de ces particules.

La norme AFNOR X 44-101 (juin 1981) définit ainsi :

Classe d'empoussièrement	**Concentration maximale, en nombre de particules par m³, pour les niveaux**	
	0,5 µm	5 µm
4 000 000	4 000 000	25 000
400 000	400 000	2 500
4 000	4 000	25

Ces valeurs sont données à titre indicatif, et constituent un niveau moyen de contamination.

Le tableau d'équivalence ci-dessous indique comment convertir cette norme en norme américaine US Fed. St. 209 E (1992):

FS 209 E / pied cube	X 44 - 101 / m3
100 000	4 000 000
10 000	40 000
100	4000

La fréquence des prélèvements est fonction du type de salle et de l'activité chirurgicale qui y est menée. Il s'agit avant tout de déterminer des tendances, et de détecter d'éventuelles déviations par rapport au niveau moyen fixé. Toute déviation significative doit entraîner une enquête immédiate pour en déterminer l'origine, et appliquer les actions devant y remédier.

Les classes des cinétiques de décontamination particulaire

Pour évaluer l'efficacité du traitement d'air, il est important de savoir comment l'air de la salle d'opération réagit en cas de contamination ponctuelle de l'air ambiant.

Pour ce faire, le principe consiste à injecter dans la salle une aérocontamination artificielle, puis à mesurer au cours du temps la décroissance de cette contamination. La mesure particulaire est la plus simple et la plus expressive, mais des mesures bactériologiques peuvent aussi être réalisées.

La norme AFNOR S 90-351 définit ainsi différentes classes :

Classe de cinétique de décontamination particulaire (CP) à 0,5 µm	Temps nécessaire pour obtenir 90 % de décontamination
CP (0,5) ...t* au choix	> 40 mn
CP (0,5) 40	≤ 40 mn
CP (0,5) 20	≤ 20 mn
CP (0,5) 10	≤ 10 mn
CP (0,5) 2	≤ 2 mn

*** t = Temps**

Ce type de mesure peut être effectué en cas de problème dans un bloc opératoire voire éventuellement une fois par an.

Fiche 5

Eau de boisson
(eau du réseau et fontaine réfrigérante)

Le décret 89-3 du 3 janvier 1989 ayant abrogé le décret n° 61-859 du 1er aôut 1961, la périodicité des contrôles faisant référence à 3 fois par an est caduque. Il revient à chaque établissement d'établir sa propre fréquence de contrôle, sachant que l'article L. 19 du Code de la Santé Publique précise :

" sans préjudice des dispositions des sections I et II au présent chapitre et de celles qui régissent les entreprises exploitant les eaux minérales, quiconque offre au public de l'eau en vue de l'alimentation humaine, à titre onéreux ou à titre gratuit et sous quelque forme que ce soit, y compris la glace alimentaire, est tenu de s'assurer que cette eau est propre à la consommation".

Quantité :

- 500 ml (300 à 600 ml selon les recherches).

Modalités :

- Après purge d'au moins une minute (débit normal du robinet).
- Ne pas faire d'écouvillonnage préalable, ne pas flamber, ne pas désinfecter pour être dans les conditions normales d'utilisation.
- Noter l'heure et le lieu du prélèvement, l'identité du préleveur, le motif de la demande (systématique ou problème particulier).

Flacon utilisé :

- Stérile avec thiosulfate de sodium (concentration finale à 0,5 %)

Délai d'acheminement et transport :

- Inférieur à une demi-heure, de préférence. Si supérieur à une demi- heure, transport à + 4° C.

Pré-stockage :

- à + 4° C, inférieur ou égal à 12 heures.

Technique :

- Homogénéiser avant d'ensemencer.
- Potabilité de type B2 : coliformes thermotolérants, streptocoques fécaux, dénombrement des bactéries aérobies revivifiables à 22° C et 37° C. Cette potabilité correspond à l'analyse sommaire proposée dans le cadre des programmes d'analyse des échantillons d'eau distribuée par un réseau collectif public ou privé (Décret n° 89-3 modifié).
- On y ajoutera si besoin une recherche spécifique en fonction de l'écologie de l'établissement (*Pseudomonas aeruginosa, Aeromonas.*, *Staphylococcus aureus,etc*...)

Fiche 5 (suite)

Milieux :

- 2 géloses dénombrement (inclusion* d'1 ml) et filtration de 100 ml sur milieux spécifiques : milieu cétrimide pour les *Pseudomonas*, milieu de Hansen et Bonde pour les *Aeromonas*, bile esculine ou Slanetz pour les streptocoques, milieu TTC pour les coliformes, Baird parker pour les staphylocoques.

Température et temps d'incubation :

- à 22° C pendant 72 h et en parallèle à 37° C pendant 24 h,
- à 41° C pendant 48 h pour le milieu cétrimide,
- à 44° C pendant 24 à 48 h pour les coliformes thermotolérants,
- à 37° C pendant 24 à 48 h pour les streptocoques fécaux.

Interprétation :

Numération :

- inférieure ou égale à 10 UFC/ml à 37° C
- inférieure ou égale à 100 UFC/ml à 22° C
- Absence de coliformes thermotolérants, de streptocoques fécaux dans 100ml.
- Pour les recherches spécifiques, en l'absence de normes, il revient à chaque établissement de réfléchir aux seuils qu'il ne veut pas dépasser en fonction des problèmes déjà rencontrés dans l'établissement.

* Inclusion : placer 1 ml de l'échantillon homogénéisé dans une boite de Pétri stérile. Verser rapidement 10 à 15 ml de milieu de culture fondu et ramené à la température de 45°C environ. Homogénéiser parfaitement. Après solidification, recouvrir avec une couche de gélose, laisser solidifier, retourner les boites et les incuber dans cette position.

Eau microfiltrée

« Eau obtenue après une technique de microfiltration. Le plus souvent, elle est produite à l'aide de filtres écran de très grande surface de filtration et de seuil d'arrêt absolu de 0,2 µm comme lors d'une filtration stérilisante. En milieu hospitalier, l'eau obtenue dans ces conditions ne peut être qualifiée de stérile car cela nécessiterait de la produire et de la répartir immédiatement en flacons sous asepsie rigoureuse dans un environnement contrôlé. Le COTEREHOS recommande la microfiltration à 0,2 µm pour obtenir l'eau bactériologiquement maîtrisée de qualité 2, dite « eau ultrapropre ».Groupe Eau Santé.

Quantité :

- 100 ml

Modalités :

- Ne pas flamber, ne pas désinfecter
- Après purge d'au moins une minute (débit normal du robinet).
- Noter les renseignements permettant de s'assurer de la traçabilité du filtre (n° du filtre, nombre de stérilisations, date et heure de pose, etc.)
- Noter l'heure du prélèvement, le lieu (n° de l'auge, etc.), l'identité du préleveur.

Flacon utilisé :

- Stérile avec thiosulfate de sodium (concentration finale à 0,5 %).

Délai d'acheminement et transport :

- Inférieur à une demi-heure de préférence. Si supérieur à une demi-heure, transport à + 4° C.

Pré-stockage :

- à + 4° C, inférieur ou égal à 12 heures.

Technique :

- Homogénéiser avant d'ensemencer. Filtration de 100ml

Milieu :

- Gélose dénombrement.

Température et temps d'incubation :

- à 22° C pendant au moins 72 heures,
- ou à 37° C pendant 24 heures et 22° C pendant 48 heures.

Interprétation :

- La numération doit être inférieure ou égale à 10 UFC/100ml.
- La numération permet d'évaluer le bon fonctionnement du filtre, l'identification importe peu dans ce cas.
- Si numération supérieure, contrôler le dispositif de microfiltration.

Fiche 7

Eau du réseau non filtrée pour lavage chirurgical des mains

Identique à la fiche 5 pour l'aspect technique du prélèvement et la référence au dénombrement des micro organismes. Il convient d'y ajouter la recherche de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Staphylococcus aureus*, *d'Aeromonas* et d'autres bactéries spécifiques selon l'écologie de l'établissement.
L'interprétation est identique à celle de la fiche 5 pour le dénombrement des germes totaux avec en plus absence des germes cités ci dessus.

Fiche 8

Eau du réseau non filtrée pour le rinçage des endoscopes

La circulaire d'avril 1996 fait référence au décret 89-3 dés le premier rinçage de l'endoscope.. Ces prélèvements peuvent être complétés par des recherches de légionnelles et de mycobactéries selon le type d'endoscopie (cf fiche 11).

Quantité:
- 500ml au minimum.
- Si recherche de légionelles : 1 litre au minimum en plus,
- Si recherche de mycobactéries atypiques : 1 litre au minimum en plus.

Modalités :
- Après purge d'au moins une minute (débit normal du robinet).
- Ne pas faire d'écouvillonnage préalable.
- Noter l'heure et le lieu du prélèvement, l'identité du préleveur, le motif de la demande (systématique ou problème particulier).

Flacon utilisé :
- Stérile avec thiosulfate de sodium (concentration finale à 0,5%)

Délai d'acheminement et transport :
- Inférieur à une demi heure de préférence. Si supérieur à une demi-heure, transport à + 4° C.

Pré-stockage :
- à + 4° C, inférieur ou égal à 12 heures.

Technique :
- Homogénéiser avant d'ensemencer.
- Potabilité de type B2.
- Si recherche de légionelles ➜ cf Norme AFNOR NF 90-131.
- Si recherche de mycobactéries atypiques : technique mise au point par chaque laboratoire spécialisé.

Milieux :
- 2 géloses dénombrement (inclusion d'1 ml) et filtration de 100ml sur milieux spécifiques: milieu cétrimide pour les *Pseudomonas*, milieu de Hansen et Bonde pour les *Aeromonas*, bile esculine ou Slanetz pour les streptocoques, milieu TTC pour les coliformes.
- Milieu GVPC pour les légionelles.
- Mélange contenant 50ml de soude à 4%, 50ml de citrate de sodium à 2,9% et 0,5g de N acétyl L cystéine pour les mycobactéries atypiques.

Température et temps d'incubation:

- à 22° C pendant 72 h et en parallèle à 37° C pendant 24h,
- à 41° C pendant 48 h pour le milieu cétrimide,
- à 44° C pendant 24 à 48 h pour les coliformes thermotolérants,
- à 37° C pendant 24 à 48 h pour les streptocoques fécaux,
- selon la norme AFNOR et la technique du laboratoire pour les légionelles et les mycobactéries atypiques.

Interprétation:

Numération :

- Inférieure ou égale à 10 UFC/ ml à 37° C,
- Inférieure ou égale 100 UFC/ ml à 22° C
- Inférieure ou égale 1000 UFC/litre pour les légionelles,
- Absence de coliformes thermotolérants, de streptocoques fécaux dans 100ml, de mycobactéries atypiques.
- Pour les recherches spécifiques, en l'absence de normes, il revient à chaque établissement de réfléchir aux seuils qu'il ne veut pas dépasser en fonction des problèmes déjà rencontrés dans l'établissement.

Glace alimentaire

Selon les recommandations du CDC, les prélèvements microbiologiques ne semblent pas nécessaires en routine. Par contre, ils peuvent être réalisés dans le cadre d'une investigation épidémiologique.

Selon le décret 89-3, la fréquence d'analyse de la glace alimentaire est de 3 fois par an.

Quantité :
- qsp 500ml

Modalités :
- Noter l'heure du prélèvement, le lieu, le numéro de la machine, l'identité du préleveur.

Flacon utilisé :
- Stérile, à ouverture large, avec thiosulfate de sodium à 0,5 %.

Délai d'acheminement et transport :
- Inférieur au temps de fonte totale.

Pré-stockage :
- à +4° C, 12 heures maximum après la fonte totale

Technique :
- Homogénéiser avant d'ensemencer.
- Potabilité de type B3 (coliformes thermotolérants, streptocoques fécaux, dénombrement des bactéries revivifiables à 22° C et à 37° C, spores de bactéries anaérobies sulfitoréductrices).
- Autre recherche spécifique si investigation épidémiologique.

Milieux :
- Gélose dénombrement et milieux spécifiques pour les streptocoques, les coliformes et les anaérobies sulfitoréducteurs
- Autre milieu conforme à une recherche particulière.

Température et temps d'incubation :
- à 22° C pendant au moins trois jours, ou à 37° C pendant 24 heures et 22°C pendant 48 heures, à 41° C pendant 48 heures pour le cétrimide, à 44° C pour les coliformes thermotolérants, à 37° C pendant 48 heures pour les anaérobies.

Interprétation :
- numération :
  - inférieure ou égale à 10 UFC/ml à 37° C
  - inférieure ou égale à 100 UFC/ml à 22° C
- Absence de coliformes thermotolérants, de streptocoques fécaux dans 100ml
- .Inférieur ou égale à une spore d'anaérobies sulfito-réducteurs /20ml.

Eau des piscines de rééducation

Fréquence des prélèvements à adapter en fonction de la fréquentation.
Les piscines de rééducation ne sont pas soumises aux obligations définies par le décret 81-324 du 7 avril 1981 fixant les normes d'hygiène et de sécurité applicables aux piscines et baignades aménagées. En l'absence de normes spécifiques, les critères des piscines publiques peuvent être appliquées.

Quantité :

- 600ml

Modalités :

- Noter l'heure du prélèvement.
- Prélever à 20 cm du bord et 30 cm de profondeur.
- Ne pas prélever en surface.
- A l'ouverture de la piscine.

Flacon utilisé :

- Stérile avec thiosulfate de sodium à 3 %, avec ouverture adaptée à un prélèvement sous la surface de l'eau.

Délai d'acheminement et transport :

- Inférieur à une demi-heure de préférence. Si supérieur à une demi-heure, transport à + 4° C.

Préstockage :

- à + 4° C, inférieur ou égal à 12 heures.

Technique :

- Homogénéiser avant d'ensemencer.
- Numération des bactéries aérobies revivifiables (inclusion de 1 ml).
- Recherche de coliformes thermotolérants et de coliformes totaux, de streptocoques fécaux.
- Recherche de *Pseudomonas* et de *Staphylococcus aureus* sur 100 ml.

Milieux :

- Gélose dénombrement, milieu TTC pour les coliformes, milieu cétrimide pour les *Pseudomonas*, Baird-Parker pour les Staphylocoques, milieu pour les Streptocoques fécaux.

Température et temps d'incubation :

- à 41° C pour *Pseudomonas* pendant 48 h, à 37° C pendant 24 h et 48h à 22°C pour la numération, à 44°C pendant 24 à 48h pour les coliformes thermotolérants, à 37° C pendant 48 h pour *Staphylococcus aureus,* les coliformes totaux et les Streptocoques fécaux.

Interprétation :

- Numération inférieure à 100 UFC par ml
- Absence de *Pseudomonas* , de *Staphylococcus aureus,* de streptocoques fécaux,
- Coliformes totaux inférieurs à 10/100ml, absence de coliformes thermotolérants dans 100ml.

Fiche 11

Legionelles

La recherche de légionelles dans une eau fait référence à deux textes officiels:

- la norme NF - 90 431 de novembre 1993 qui en donne le mode opératoire
- la circulaire DGS 97 311 du 24 avril 1997 qui donne la conduite à tenir en cas de légionellose dans un établissement et fixant un seuil de 10^3/1litre

Mycobactéries atypiques

La technique de recherche des mycobactéries atypique a déjà été uniformisée à l'intérieur du CCLIN dans le cadre du groupe de travail sur l'eau et plus particulièrement sur la glace alimentaire. (cf. fiche 14)

Fiche 12

Sensibilité aux antibiotiques et aux désinfectants. Intérêt de la biologie moléculaire

Pas de recherche systématique mais en fonction de l'écologie et des données épidémiologiques, telle ou telle résistance pourra être recherchée.

En cas de problème révélé par des mauvais résultats d'environnement non liés aux protocoles, on peut être amené à vérifier l'efficacité des désinfectants sur telle ou telle souche.

Le choix de conserver ou non les souches sera fait en fonction de l'écologie de l'établissement ou d'un contexte épidémiologique pour analyse complémentaire.

Lorsqu'on est en présence de souches pathogènes identiques dans l'environnement et chez les malades et/ou en cas d'épidémie, il convient de les comparer par une technique adaptée de typage moléculaire (ex : ECP, RAPD, etc.). Cela peut permettre la mise en évidence d'une voie de transmission, d'un réservoir et peut confirmer ou infirmer une épidémie.

Groupe CCLIN Sud-Ouest concerant les marqueurs moléculaires des Infections Nosocomiales :

Coordonnateur : Monsieur le Professeur FAUCHERE - CHU de Poitiers

Laboratoires participants :

- CHU de Bordeaux (Pr BEBEAR)
- Faculté de Pharmacie Université Bordeaux II (Pr QUENTIN)
- CHU de Limoges (Pr DENIS)
- CHU de Toulouse Purpan (Pr DABERNAT)
- CHU de Toulouse Rangueil (Pr MARTY)

Fiche 13

Envoi des résultats

Les résultats sont envoyés aux responsables des services concernés dont la désignation revient à la charge du CLIN, accompagnés d'un commentaire écrit par le biologiste.

L'interprétation de ces résultats tient compte :

- Des paramètres spatio-temporels des prélèvements,
- De l'objectif recherché,
- De la comparaison des résultats qualitatifs et quantitatifs,
- Des résultats précédents.

Tout résultat mettant en jeu un risque infectieux immédiat doit être signalé le plus rapidement possible. Les mesures correctives pourront ainsi être envisagées au plus vite avec les services concernés.

Lorsque des contrôles sont réalisés à visée pédagogique, il faut s'assurer que leur diffusion fait bien l'objet de la réflexion sur la pratique souhaitée en matière de nettoyage et de désinfection des locaux. Dans ce cadre, la participation de représentants de l'unité d'hygiène hospitalière et/ou d'une "conseillère technique" à une réunion avec l'équipe concernée est souhaitable.

Fiche 14
Lexique des neutralisants et des milieux utilisés

<u>Milieu pour recherche de mycobactéries</u> : (exemple de technique)

- filtrer 100 ml sur filtre 0,45 µm
- Traiter le filtre comme un "crachat"
- préparer extemporanément le mélange A suivant :
  50 ml de soude à 4 %
  50 ml citrate de sodium à 2,9 %
  0,5 g de N acétyl L cystéine
- mélanger volume à volume filtre et mélanger A (5 à 10 ml) + billes de verre
- agiter pendant 20 minutes
- reprendre le surnageant
- compléter à 50 ml avec du tampon phosphate (pH = 6,8)
- centrifuger 30 minutes à 3 000 tours par minute
- décanter
- reprendre le culot par 1 ml de tampon phosphate (pH = 6,8)
- ensemmencer sur milieu spécifique.

<u>Milieu Baird-Parker</u> : milieu utilisé pour la recherche et le dénombrement de *Staphylococcus aureus*.

- Milieu déshydraté : (en grammes par litre d'eau distillée)

- Tryptone	10
- Extrait de levure	1
- Extrait de viande	5
- Glycocolle	12
- Chlorure de lithium	5
- Pyruvate de sodium	10
- Agar	14

pH final = 7,2 ± 0,2

Remarque : pour prêt à l'emploi (flacon 100 ml), la base doit être complémentée en glycocolle et pyruvate.

<u>Milieu cétrimide</u> :

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)

- Peptone	20
- Sulfate dipotassique	10
- Chlorure de magnésium	1,4
- Cétrimide	0,3
- Agar	13,6
- Glycerol	10 ml

pH : 7,2 ± 0,2

<u>Milieu pour dénombrement (P.C.A.)</u> :

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)

- Peptone	5
- Extrait de levure	2,5
- Glucose	1
- Agar	15

pH final : 7,0 ± 0,2

Milieu Slanetz et Bartley : (milieu de base et milieu complet)

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)

▲ **Milieu de base** :

- Hydrolysat trypsique de caséine	20
- Extrait de levure	5
- Glucose	2
- Phosphate disodique	4
- Azide de sodium	0,4
- Agar	10

▲ **Milieu complet** : même formule que milieu de base +

- Chlorure de triphémyltétrazolium (T.T.C.)	0,1

pH final : 7,2 ± 0,2

Milieu pour recherche des Aeromonas dans les eaux :

Milieu de Hansen et Bone (1973)

- Bacto Beef extract	3 g
- Bacto peptone	5 g
- Agar	15 g
- Eau distillée	900 ml
- P H	7,2

Après autoclavage à 115° et refroidissement aux environs de 45° Celsius ajouter la solution suivante que l'on aura fait bouillir quelques minutes :

- Desoxycholate de Na	3 g
- Bleu de bromothymol	0,80 g
- Amidon	10 g
- Eau distillée	100 ml

Milieu pour recherche de Clostridium : Viande-Foie

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)

- Base viande-foie	30
- Glucose	2
- Agar	6

pH final = 7,6 ± 0,2

Milieu pour la recherche et le dénombrement des coliformes : T.T.C.

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)

- Lactose	20
- Peptone	10
- Extrait de levure	6
- Extrait de viande	5
- Bleu de bromothymol	0,05
- Agar	12,75

pH final = 7,2 ± 0,2

Liste non limitative de neutralisants de l'activité antibactérienne

Pour les produits phéniqués:

- jaune d'oeuf frais dilué à 5% ou à 0,5% (v/v)
- préparation contenant 3% de polysorbate 80 (Tween 80) (v/v)
  0,4% de lauryl sulfate de sodium (m/v)
  0,3% de lécithine (m/v)
- préparation contenant 5% de jaune d'oeuf frais (v/v)
  4% de polysorbate 80 (v/v)
- préparation contenant 7% de condensat d'oxyde d'éthylène en alcool gras (m/v)
  2% de lécithine (m/v)
  4% de polysorbate 80 (v/v)
- préparation contenant 4% de condensat d'oxyde d'éthylène sur alcool gras (m/v)
  4% de lécithine

Pour les aldéhydes:

- préparation contenant 3% de polysorbate 80 (v/v)
  0,3% de lécithine (m/v)
  0,1% de L-histidine (m/v)
- glycine en fonction de la concentration du produit

Pour les ammoniums quaternaires:

- jaune d'oeuf frais dilué à 5% (v/v)
- préparation contenant 5% de jaune d'oeuf frais (v/v)
  3% de polysorbate 80 (v/v)
- préparation contenant 3% de condensat d'oxyde d'éthylène sur alcool gras (m/v)
  2% de lécithine (m/v)
- préparation contenant 10% d'une émulsion de phospholipides à 50 mg/ml (m/v)

Pour les organo-mercuriels et les produits contenant d'autres métaux lourds :

- thioglycolate de sodium à 0,05% ou 0,5% (m/v)
- L-cystéine à 0,08% ou 0,15% (m/v)
- acide thiomalique à 0,075 % (v/v) ramené à pH 7 par l'hydroxyde de sodium.

Pour les dérivés halogénés : *(hypoclorite, chloramine T, iodophores, etc...)*

- Thiosulfate de sodium à 0,5 % (m/v)

Pour les péroxydes :

- Catalase
- Péroxydase

} Pour ces deux enzymes une unité catalyse la décomposition de 1,4 mole de péroxyde d'hydrogène par minute à 25 ° et pH 7

REfErences bibliographiques

1. Hygiène hospitalière pratique - Dauphin A, Darbord JC - Ed. Médicales Internationales - 1998

2. Guide technique d'hygiène hospitalière - Girard R, Mounet D, Fabry J - CCLIN Sud-Est - Ed. Fondation Marcel Mérieux - 1993

3. Guide du bionettoyage - Commission Centrale des Marchés - GPEM / SL - Recommandations n° E - 1 - 90 - Direction des Journaux Officiels - Paris - Réimpression 1994

4. Manuel de bactériologie clinique - Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C - Volume 1 - Deuxième édition - Collection Option BIO

5. Décret n° 89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles (J.O. du 4 janvier 1989) modifié par le décret n° 90-330 du 10 avril 1990.

6. DRASS Rhône-Alpes - COTEREHOS - Mars 1995 " l'eau et ses usages "

7. Groupe Eau Santé - Eau à Usage Médical - Définitions et interprétations pratiques - Janvier 1998 (ASTA MEDICA).

8. Traitement de l'air en milieu hospitalier - Les guides pratiques d'Uniclima - 1997.